

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 04329357
PUBLICATION DATE : 18-11-92

APPLICATION DATE : 01-05-91
APPLICATION NUMBER : 03193768

APPLICANT : SHINOTESUTO:KK;

INVENTOR : MOTONAGA HIDEO;

INT.CL. : G01N 33/536

TITLE : IMMUNOLOGICAL MEASURING METHOD

ABSTRACT : PURPOSE: To prevent a disturbance caused by a nonspecific reaction by adding at least one kind of urea, thiocyanate and hydrochloric acid guanidine into a reagent at the optimum concentration in the immune nephelometry.

CONSTITUTION: A sample is added to a reagent, the turbidity of an immune composite body is measured and compared with the turbidity measured in advance to obtain antigenic concentration in the immune nephelometry, and at least one kind of urea, thiocyanate and hydrochloric acid guanidine is added into the reagent at the optimum concentration to prevent a nonspecific reaction. An antigen measurable by the immune nephelometry is used, and sodium thiocyanate is used for the thiocyanate, for example. The optimum concentration differs according to the type of antigens and the type of chemicals, in the measuring system of CRP, for example, the optimum concentration is set to 0.25-0.75mol/L for urea, 0.09-0.31mol/L for sodium thiocyanate, 0.09-0.48mol/L for hydrochloric acid guanidine, and a nonspecific reaction can be suppressed by adding them.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-329357

(43) 公開日 平成4年(1992)11月18日

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/536

識別記号 庁内整理番号
F 8310-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1(全7頁)

(21) 出願番号 特願平3-193768

(22) 出願日 平成3年(1991)5月1日

(71) 出願人 000131474

株式会社シノテスト
東京都千代田区一番町10番地

(72) 発明者 本永 秀夫

神奈川県相模原市大野台2丁目29番14号
株式会社シノテスト相模原事業所内

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【目的】 免疫比濁法において、非特異的反応による妨害を防止する。

【構成】 免疫比濁法によって試料中の抗原濃度を測定するのに、尿素、チオシアニン酸塩および塩酸グアニジンの少なくとも一種類を、抗体を溶解した試薬中に非特異的反応を防止するのに至適な濃度で添加する。

って、担体を用いた凝集法でなし得た技術がそのまま本発明で問題にしている免疫比濁法に適用できるとは考えられない。担体を用いた凝集反応に尿素をはじめ塩酸グアニジンあるいはチオシアノ酸塩（以下、これら薬剤と省略する）を添加することを思い付いても、免疫比濁法にこれら薬剤を添加しようとは誰しも考えなかつた。なぜなら、これら薬剤は水素結合やイオン的結合をはじめ、分子の会合体の形成を妨害する一種のカオトロピックイオンとしての作用があることが知られているからである。

【0009】抗原抗体反応あるいは免疫複合体が集合して沈降物を形成する反応は水素結合をはじめ分子の会合力も大きく作用している。従つて、これら薬剤を含む溶液の中では抗原抗体反応や沈降物の形成が妨害されるることは当業者の間ではよく知られている。この性質を利用してアフィニティーコロマトグラフでは、適当な担体に固定した抗体や抗原で試料中の抗原や抗体をトラップし、未結合成分を洗浄した後3mo1/Lチオシアノ酸ナトリウムや8mo1/L尿素溶液を通して抗原や抗体を溶出させる方法を日常的に利用している。

【0010】一般に、これら薬剤は免疫学的な反応を妨害する物質として認識されている。しかし、本発明者は鋭意研究の結果これら薬剤の濃度を限定し至適濃度で使用することで、免疫比濁法の測定感度をほとんど減じることなく非特異的反応を防止できることを見いだしこの発明を完成させた。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は上記課題を解決するために、抗体を溶解した試薬に抗原を含む試料を添加し、一定時間後に生じた免疫複合体の濁度を測定し、濃度既知の試料によってあらかじめ測定された濁度と比較することによって試料中の抗原濃度を求める免疫比濁法において、試薬中に尿素、チオシアノ酸塩および塩酸

グアニジンの少なくとも1種類を非特異的反応を防止するのに至適な濃度で添加することを特徴とする免疫学的測定方法を提供する。

【0012】本発明において、試料としては、ヒトあるいは動物の血液、血清、血漿、尿、脑液、唾液、汗、腹水、羊水、ヒトあるいは動物の細胞あるいは臓器の抽出液等が対象となる。

【0013】抗原としては、免疫比濁法により測定可能なものであればいかなるものも対象となるが、例としては、イムノグロブリン（Ig）G、IgM、IgA、補体C3、補体C4、C反応性タンパク質（CRP）、トランスフェリン、 α 1-アシドグリコプロテイン、ハブトグロブリンなどが挙げられる。

【0014】抗体は、試料に含まれる抗原に対して特異的な抗体であれば良い。

【0015】一定時間とは、抗体を溶解した試薬に抗原を含む試料を添加することによって生成する免疫複合体の濁度が測定可能な範囲にある任意の時間でよい。また、濁度の測定は、1回でも良いし、免疫反応中複数回測定しても良い。

【0016】チオシアノ酸塩としては、チオシアノ酸ナトリウム、チオシアノ酸カリウム、チオシアノ酸カルシウム、チオシアノ酸アンモニウム等のチオシアノ酸塩を用いることができる。

【0017】非特異的反応を防止するのに至適な濃度について以下説明を行う。表1は後述の実施例1に示した免疫比濁法の基礎試薬に至適量の抗ヒトCRPウサギ抗体および、Aは尿素、Bはチオシアノ酸ナトリウム（チオシアノ酸Na），Cは塩酸グアニジンを添加した試薬で、ヒト血清試料中のCRP値を免疫比濁法によって測定したデータである。

【0018】

【表1】

添加薬剤の濃度とC3およびC4の測定値					
D (尿素添加)			E (チオシアノ酸ナトリウム添加)		
添加濃度 (mol/L)	C3測定値 (mg/L)	C4測定値 (mg/L)	添加濃度 (mol/L)	C3測定値 (mg/L)	C4測定値 (mg/L)
0.00	1000	300	0.00	980	310
0.09	950	290	0.04	960	290
0.19	930	280	0.08	960	280
0.37	840	273	0.12	870	220
0.56	730	250	0.16	780	147
0.75	660	220	0.20	690	110
SRID法 : 940±30 : 270±30			SRID法 : 940±30 : 270±30		

【0022】Dでは添加薬剤として尿素、Eはチオシアノ酸ナトリウムを添加した。SRID法ではC3は940±30mg/L、C4は270±30mg/Lと測定された。しかし、これら薬剤を添加しない免疫比濁法では各々、980~1000mg/Lと300~310mg/Lとやや高値となることが分かる。しかし、いずれの測定系でもこれら薬剤を多量に添加すると、測定値は低下することも分かる。

【0023】これら薬剤の至適濃度は以上のデータからも示されるように、測定する抗原の種類およびこれら薬剤の種類によって異なる。CRPの測定系で尿素の至適量はおおよそ0.25から0.75mol/L、望ましくは0.3から0.58mol/Lの範囲内である。またチオシアノ酸ナトリウムはおおよそ0.09から0.31mol/L、望ましくは0.12から0.22mol/Lの範囲内である。更に塩酸グアニジンは0.09から0.48mol/L望ましくは0.10から0.4*

免疫比濁法の基礎試薬

ポリエチレングリコール (PEG) #6000	3.5%
pH8.0 トリス塩酸緩衝液	10mmol/L
塩化ナトリウム	0.9%

【0026】この免疫比濁法の基礎試薬に尿素を0.42mol/Lになるように添加した試薬と尿素を添加しない試薬のそれぞれを第一試液とし、次にペッカーユニット

*0mol/Lである。C3およびC4測定系において、尿素の至適量はおおよそ0.05から0.33mol/L、望ましくは0.08から0.25mol/Lである。また、チオシアノ酸ナトリウムではおおよそ0.04から0.09mol/L、望ましくは0.06mol/L付近である。しかし、ここに示した数値によって本発明の薬剤の至適濃度は特に限定されるものではなく、実際には薬剤の種類および測定すべき抗原物質やそれにに対する抗体の種類によって至適濃度は決定されるものである。更に、実施例によってその効果を説明する。

【0024】

【実施例】以下、実施例に従って本発明を説明するが、本発明はこれら実施例によって何等限定されるものではない。

【0025】実施例1

免疫比濁法の基礎試薬として、以下の組成の溶液を調製した。

4mg/mLの抗ヒトCRPウサギ抗体液を6v/v%になるように免疫比濁法の基礎試薬に添加したものと第一試液とした。第一試液260μLに試料血清またはC

11

12

CRP測定における尿素の添加効果 (2)							
尿素を添加しない時				尿素を添加した時			
		SRID法				SRID法	
		(+)	(-)			(+)	(-)
免 疫 比 漏 法	(+)	20	5	免 疫 比 漏 法	(+)	20	2
	(-)	0	30		(-)	0	33
合計		20	35	合計		20	35
感度		100%		感度		100%	
特異度		85.7%		特異度		94.3%	

【0031】尿素の非添加と添加で免疫比漏法の測定感度は100%と変わらないが、特異度は85.7%、および94.3%と尿素を添加することで8.6ポイント上昇した。

【0032】

【発明の効果】抗体を溶解した試薬に抗原を含む試料を添加し、一定時間後に生じた免疫複合体の濁度を測定し、濃度既知の試料によってあらかじめ測定された濁度

と比較することによって、試料中の抗原濃度を求める免疫比漏法において、試薬中に尿素、チオシアニ酸塩および塩酸グアニジンの少なくとも1種類を至適濃度で添加することによって、非特異的反応を抑制し、測定感度(真の陽性の検出度)を低下させることなく特異度(真の陰性の検出度)を有意に上昇させることを可能にした。